

Controlling biochemical liq. injection into multiple oocytes - by automatic delivery from valve-controlled cannula

Publication number: DE4004198

Publication date: 1991-08-14

Inventor: MORRISON ALISON DR (DE); HUBER JUERGEN (DE)

Applicant: MAX PLANCK GESELLSCHAFT (DE)

Classification:

- international: **B01L3/02; C12M3/00; G01N35/04; G01N35/10; B01L3/02; C12M3/00; G01N35/04; G01N35/10; (IPC1-7): B01J4/02; B25J7/00; G01F13/00; G01N35/00; G05D3/12; G05D7/06**

- European: **B01L3/02C; C12M3/00E**

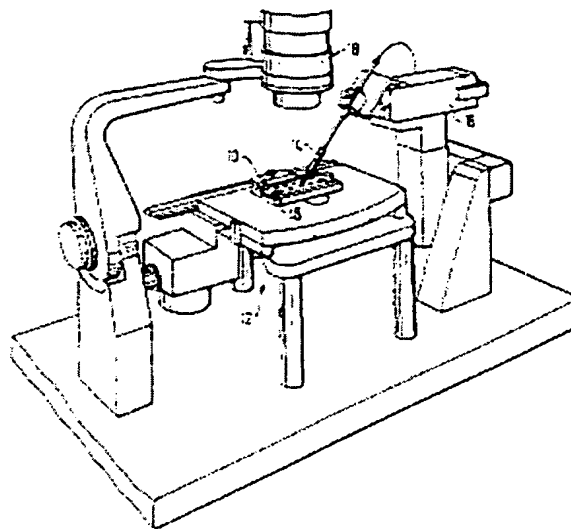
Application number: DE19904004198 19900212

Priority number(s): DE19904004198 19900212

[Report a data error here](#)

Abstract of DE4004198

Biochemical samples (44) are injected with metered amts. of additive from a canule (14), with the sample holder positioned relative to the canule tip by an electrically controlled motorised feeder (10,38). The manipulator (16) for the canule is coupled alternately to a pressure source (26) and vacuum source (22) via a valve system subject to a programmed controller. The samples are held in a grid of holes in a plate formed of thermally sterilisable material and with heavy handles (40) preventing the plate from floating in liq. held in a base dish (36). The samples, esp. early stage ova (oo cytes) first receive the canule in vertical position before axial movement. **USE/ADVANTAGE** - Suitable for injecting a RNA (messenger ribonucleic acid) without requiring highly skilled operators.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 04 198 A 1**

⑳ Aktenzeichen: P 40 04 198.0
㉑ Anmeldetag: 12. 2. 90
㉒ Offenlegungstag: 14. 8. 91

㉓ Int. Cl.⁵:
G 05 D 7/06
G 05 D 3/12
G 01 F 13/00
B 01 J 4/02
B 25 J 7/00
G 01 N 35/00
// C12M 1/00, C07H
21/02

DE 40 04 198 A 1

㉔ Anmelder:
Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der
Wissenschaften eV, 3400 Göttingen, DE

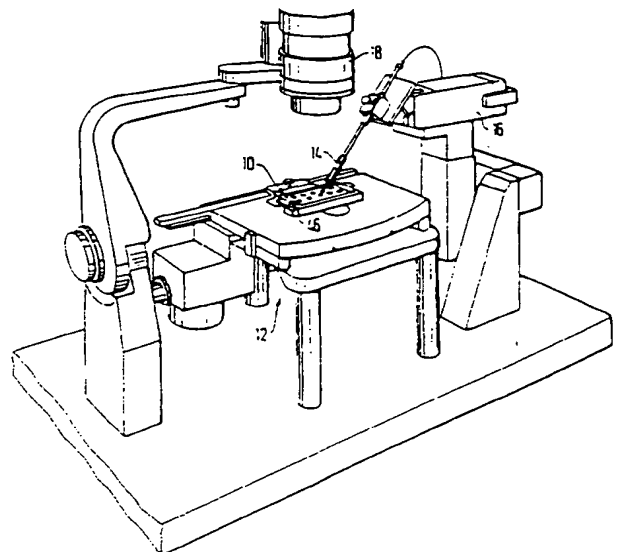
㉕ Vertreter:
von Bezold, D., Dr.rer.nat.; Schütz, P., Dipl.-Ing.;
Heusler, W., Dipl.-Ing., Pat.-Anwälte, 8000 München

㉖ Erfinder:
Morrison, Alison, Dr.; Huber, Jürgen, 4600
Dortmund, DE

㉗ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht zu ziehende Druckschriften:

DE 39 05 622 A1
DE 37 36 623 A1
DE 37 18 066 A1
DE 36 21 586 A1
DE 79 24 781 U1
DE 38 24 547
DE 35 06 110
DE 16 98 240
CH 6 66 850 A5
FR 82 13 405
FR 13 32 736
US 46 56 007
WO 87 02 138 A1
DE-Z: Feinwerktechnik & Messtechnik 90, H.1, 1981,
S.24;

- ㉘ Gerät zum dosierten Einführen einer Substanz in eine Anzahl von Substraten .
㉙ Gerät zum Einführen von jeweils einer dosierten Substanz-
menge in vorgegebene Substrate, z. B. von mRNA in
Oocyten, mit einer Vorrichtung (10) zum Haltern der einzel-
nen Substrate, einem Behälter (46) zur Aufnahme eines
Vorrats der Substanz, einer Injektionskanüle (14) zur Aufnah-
me und Injektion der Substanz, einer motorgetriebenen
Vorrichtung, wie einem Kreutztisch (12), zum Positionieren
der Substrathalterungsvorrichtung (10), einem Manipulator
(16) zum Bewegen der Injektionskanüle (14), eine Vakuum-
quelle sowie eine Druckgasquelle, die über eine elektrisch
steuerbare Ventilanordnung mit der Injektionskanüle verbun-
den sind, und eine Steuereinheit zum Steuern der Positionie-
rungsvorrichtung, des Manipulators und der Ventilanord-
nung.



DE 40 04 198 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Gerät zum dosierten Einführen einer Substanz in vorgegebene Substrate.

In der biochemischen Forschung tritt häufig die Aufgabe auf, in eine vorgegebene Anzahl von Substraten jeweils eine dosierte Menge einer bestimmten Substanz einzuführen. Ein typisches Beispiel ist die Injektion von mRNA (Boten-Ribonukleinsäure) in Oocyten (Eizellen). Dies wurde bisher mittels einer Kanüle in Form einer Glaskapillare von Hand durchgeführt. Solche Arbeiten sind zeitraubend, erfordern qualifiziertes Personal und sehr sorgfältiges Arbeiten.

Die in den Ansprüchen gekennzeichnete und im folgenden näher erläuterte Erfindung löst die Aufgabe, ein Gerät zum dosierten Einführen einer Substanz in vorgegebene Substrate anzugeben, das selbsttätig, schnell und sehr exakt arbeitet.

Mit dem erfindungsgemäßen Gerät kann in jedes der auf einer Halterungsvorrichtung gelagerten Substrate eine exakt dosierte Substanzmenge eingeführt werden. Das Gerät arbeitet schnell und exakt. Es ist sehr flexibel.

Im folgenden wird ein bevorzugtes Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Gerätes unter Bezugnahme auf die Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

Fig. 1 eine perspektivische Darstellung einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Gerätes;

Fig. 2 eine schematische Darstellung der Steuereinrichtung des Gerätes gemäß **Fig. 1**;

Fig. 3 eine Draufsicht auf eine Substrathalterungsvorrichtung des Gerätes gemäß **Fig. 1** und **2**, und

Fig. 4 eine weiter vergrößerte Schnittansicht in einer Ebene IV-IV der **Fig. 3**.

Das im folgenden beschriebene Ausführungsbeispiel des erfindungsgemäßen Gerätes dient dazu, in eine größere Anzahl von Oocyten jeweils eine dosierte, kleine Menge mRNA zu injizieren. Wie **Fig. 1** zeigt, enthält das Gerät eine Halterungsvorrichtung **10** für die Oocyten, die anhand der **Fig. 3** und **4** noch näher erläutert werden wird, ferner eine Positionierungsvorrichtung für die Halterungsvorrichtung, die bei dem vorliegenden Ausführungsbeispiel aus einem motorgetriebenen Kreuztisch **12** besteht, eine Injektionskanüle **14**, einen Mikromanipulator **16** zur Bewegung der Injektionskanüle und ein nur teilweise dargestelltes Mikroskop **18**, das zur Justierung und zur Beobachtung des Injektionsvorganges dient.

Wie **Fig. 2** schematisch zeigt, ist die Kanüle **14** über ein erstes Magnetventil **20** mit einer Vakuumquelle **22**, z. B. einer Vakuumpumpe mit Pufferbehälter, und über ein zweites Magnetventil **24** mit einer Druckgasquelle **26**, insbesondere einer Stickstoff-Flasche verbunden.

Die Steuereinrichtung des Gerätes enthält eine Steuereinheit **28**, insbesondere einen PC, die mit einer Eingabevorrichtung **30** verbunden ist und Signale zur Steuerung einer Antriebsvorrichtung **32** für den Kreuztisch **12**, einer Antriebsvorrichtung **34** für den Mikromanipulator **16** sowie der Magnetventile **20** und **24** liefert. Die Eingabevorrichtung enthält einen Steuerhebel.

Die Halterungsvorrichtung **10**, die durch den Kreuztisch in einer x-Richtung und einer y-Richtung verstellbar ist, enthält eine Wanne **36** aus PMMA oder einen anderen geeigneten Kunststoff, in der eine aus dem gleichen oder einem ähnlichen Material bestehende Lochplatte **38** angeordnet ist. Die Lochplatte **38** hat zwei Griffe **40** und weist eine Mehrzahl von Löchern **42** zur

Aufnahme und Halterung jeweils einer Oocyte **44** (**Fig. 4**) auf. Die massiven Griffe **40** bestehen aus Metall und dienen zusätzlich zur Gewichtserhöhung um ein Schwimmen der Lochplatte in einer in der Wanne **36** enthaltenen Lösung zu verhindern. Auf dem einen, etwas verbreiterten Rand an der einen Schmalseite der Wanne **36** ist ein Behälter **46** für die zu injizierende Substanz, also hier mRNA, befestigt. Der Behälter **46** besteht aus einem wärmosterilisierbaren (autoklavierbaren) Material, wie einem Fluorkunststoff oder Polycarbonat.

Bei dem beschriebenen Ausführungsbeispiel haben die beschriebenen Komponenten die folgenden Merkmale:

Die Wanne **36** ist etwa 80×40 mm groß.

Die Lochmaske hatte bei dem vorliegenden Beispiel 8×13 Löcher **42** mit einem Durchmesser von jeweils $1,1$ mm.

Der Kreuztisch **10** hat einen Fahrweg von mindestens 80×40 mm sowie eine Schrittweite von $1/100$ mm.

Die Injektionskanüle **14** hat als Spitze eine Glaskapillare **48** mit einem Spitzendurchmesser von $10 \mu\text{m}$.

Der Mikromanipulator **16** ist mindestens zweiachsig, so daß die Glaskapillare **48** zuerst von oben auf die Oocyte **44** gedrückt werden kann, um eine Verdrehen der Oocyte zu verhindern, wie in **Fig. 4** durch einen Pfeil **50** und die gestrichelte Darstellung der Glaskapillare dargestellt ist. Anschließend erfolgt der Einstechvorgang durch axiales Verschieben der Glaskapillare **48**, wie durch einen Pfeil **52** angedeutet ist.

Als Mikroskop **18** genügt eine Ausführung mit einer festen Vergrößerung von ca. 10-fach bis 15-fach. Besonders zweckmäßig ist eine schwenkbare Montierung, die ein genaues Positionieren der Kapillare in senkrechter Richtung und eine präzise Einstellung der Einstechtiefe aus einem Winkel von ca. 15° ermöglicht.

Der Mikromanipulator **16** hat eine Schrittweite von 300 nm, eine größere Schrittweite würde hier jedoch auch ausreichen.

Bei Beginn eines Injektionszyklus wird das Ventil **20** durch ein entsprechendes Signal von der Steuereinheit **28** geöffnet um eine größere Menge von Injektionsflüssigkeit, also mRNA, anzusaugen. Bei den anschließenden Injektionsvorgängen wird dann das Ventil **24** kurzzeitig geöffnet, um eine dosierte Menge der angesaugten Flüssigkeit zu injizieren, z. B. 50 nl pro Oocyte. Die derzeit verwendete Kapillare hat ein Aufnahmevermögen von ca. $30 \mu\text{l}$, was für etwa 60 Injektionen ausreicht. Die Anordnung des Vorratsgefäßes **46** auf der Wanne **36** bzw. dem Kreuztisch hat den Vorteil, daß die Kanüle für mehrere Injektionen nachgefüllt werden kann, ohne daß eine Neujustierung des Gerätes erforderlich ist.

Durch geeignete Programmierung des PC lassen sich Anzahl und Ort der injizierten Substrate, sowie die injizierte Substanzmenge nach Wunsch steuern. Im Programm sind Funktionen zur Justierung der Kapillarspitze, zur Bestimmung der Injektions- und Vakuumdauer, zur Steuerung von Einzel- und Reiheninjektionen gespeichert.

Das beschriebene Ausführungsbeispiel läßt sich selbstverständlich in der verschiedensten Weise abwandeln ohne den Rahmen der Erfindung zu überschreiten. Das Gerät kann zur dosierten Injektion anderer Substanzen in andere Substrate als beschrieben dienen. Es können mehrere Substanzbehälter sowie Behälter für Reinigungsflüssigkeiten vorgesehen sein. Selbstverständlich sind die Abmessungen und Materialangaben ebenfalls nur Beispiele. Die Wanne **36** und/oder der

bzw. die Substanzbehälter 46 und/oder die Lochplatte 38 können aus einem Stück eines sterilisierbaren Materials bestehen. An die Stelle des Mikroskops kann eine Videokamera mit geeignetem Objektivsystem verwendet werden oder das Mikroskopokular kann durch eine Videokamera ersetzt werden.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Patentansprüche

1. Gerät zum Einführen von jeweils einer dosierten Menge einer Substanz in eine Anzahl von Substraten (44), mit
 - a) einer Vorrichtung (10, 38) zum Haltern der einzelnen Substrate (44),
 - b) einer Injektionskanüle (14) zum Injizieren der Substanz in die Substrate,
 gekennzeichnet durch
 - c) eine durch elektrische Signale steuerbare, motorgetriebene Vorrichtung (12), zum Positionieren der Halterungsvorrichtung (10, 38),
 - d) einen Manipulator (16) zur Bewegung der Injektionskanüle (14),
 - e) einer Vakuumquelle (22),
 - f) einer Druckmittelquelle (26),
 - g) einer Ventilanordnung (20, 24) zum Verbinden der Vakuumquelle (22) sowie der Druckmittelquelle (26) mit der Injektionskanüle (14), und
 - h) eine programmgesteuerte Steuereinrichtung (28) zur Steuerung der Positionierungsvorrichtung (12), des Manipulators (16) sowie der Ventilanordnung (20, 24).
2. Gerät nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch mindestens einen Behälter (46) zur Aufnahme der Substanz, welcher zusammen mit der Halterungsvorrichtung (10, 38) durch die Positionierungsvorrichtung (12) positionierbar ist.
3. Gerät nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter (46) an der Substrathalterungsvorrichtung (10) angebracht ist.
4. Gerät nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Behälter (46) aus einem wärmesterilisierbaren Material besteht.
5. Gerät nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Halterungsvorrichtung eine regelmäßige Anordnung von Löchern (42) zur Aufnahme jeweils eines Substrats (44) aufweist.
6. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Halterungsvorrichtung (10) eine Wanne (36) sowie eine in die Wanne passende Platte (38) enthält, welche eine regelmäßige Anordnung von Löchern (42) zur Aufnahme jeweils eines Substrats (44) aufweist.
7. Gerät nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Platte (38) mit massiven Griffen (40) versehen ist, die der Platte ein solches Gewicht verleihen, daß sie in einer in der Wanne (36) enthaltenen Flüssigkeit nicht schwimmt.
8. Gerät nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Manipulator (16) und die Steuereinrichtung (18) so ausgebildet sind, daß die Spitze (48) der Injektionskanüle zuerst vertikal (50) und dann axial (52) bewegbar ist.
9. Gerät nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Positionierungsvorrichtung (12) einen Kreutztisch enthält.

FIG. 1

